# 补喂硫酸钠、微量元素及其组合对哈萨克孕马 3 种雌激素硫酸盐日排出量的影响

李晓斌　陈　晖　赵　芳　谢景龙　杨菊青　杨开伦*

（新疆农业大学，新疆肉乳用草食动物营养实验室，乌鲁木齐 830052）

摘　要：本试验旨在研究补喂硫酸钠、微量元素及其组合对妊娠中后期哈萨克母马血浆和尿中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠含量以及上述 3 种雌激素硫酸盐日排出量的影响。选择年龄 5～7 岁、胎次 2～4 胎的妊娠中期哈萨克母马 34 匹，随机分为 4 组，其中对照组 9 匹、试验Ⅰ组 9 匹、试验Ⅱ组 8 匹、试验Ⅲ组 8 匹，在相同的饲养条件下，进行 90 d 的补饲试验。对照组试验第 1～30 天每匹马每天补喂 50 g 玉米粉，第 31～90 天补喂 100 g 玉米粉；试验Ⅰ组第 1～30 天每匹马每天补喂 50 g 玉米粉+6 g 硫酸钠，第 31～90 天补喂 100 g 玉米粉+12 g 硫酸钠；试验Ⅱ组第 1～30 天每匹马每天补喂 50 g 玉米粉+5 g 微量元素，第 31～90 天补喂 100 g 玉米粉+5 g 微量元素；试验Ⅲ组第 1～30 天每匹马每天补喂 50 g 玉米粉+6 g 硫酸钠+5 g 微量元素，第 31～90 天补喂 100 g 玉米粉+12 g/d 硫酸钠+5 g 微量元素。结果显示：1）与对照组相比，补喂硫酸钠、微量元素及其组合能够提高孕马血浆中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的含量，但各组间差异不显著（$P>0.05$）。2）在试验期内的各采样时间点，各试验组孕马尿中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的含量与对照组均无显著差异（$P>0.05$），但各试验组孕马尿中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的含量在数值上均高于对照组。试验Ⅲ组第 30 天时孕马尿中上述 3 种雌激素硫酸盐的含量均最高。3）试验第 30 天、第 60 天、第 90 天，试验Ⅲ组 3 种雌激素硫酸盐的日排出量均显著或极显著高于对照组（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。由此可见，给哈萨克孕马补喂硫酸钠和微量元素的组合能够提高尿中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的含量，从而显著或极显著提高雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的日排出量。

关键词：哈萨克孕马；硫酸钠；微量元素；雌激素硫酸盐

---

收稿日期：2018-03-23

基金项目："十二五"农村领域国家科技计划课题(2012BAD45B01)

作者简介：李晓斌（1988-），男，甘肃天水人，博士，研究方向为草食动物营养代谢。E-mail：172387243@qq.com

*通信作者：杨开伦，教授，博士生导师，E-mail：　yangkailun2002@aliyun.com

中图分类号：R335　文献标识码：A　文章编号：

孕马尿中含激素类物质、有机酸、无机酸、无机盐等多种有效成分。激素类物质均以结合的、非结合的雌激素、孕激素及雄激素形式存在于孕马尿中[1-3]。研究显示，孕马尿中雌激素的含量在70～130 mg/L，而1个孕期内孕马尿中雌激素含量可达50～100 g/匹[4]。因此，孕马尿成为获取天然雌激素物质的主要原料。结合雌激素是孕马尿中有效的生物成分之一，是雌激素通过葡糖醛酸化和硫酸盐化作用形成的激素类物质。孕马尿中的雌激素硫酸盐是主要以雌酮硫酸钠（sodium estrone sulfate，Es-S）、马烯雌酮硫酸钠（sodium equilin sulfate，Eq-S）、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠（sodium 17α-dihydroequilin sulfate，2H-Eq-S）的形式存在，三者含量之和占激素类物质总量的90%以上，是孕马尿中结合雌激素的指标性成分。研究证明，结合雌激素在临床上主要用于激素替代疗法(hormone replacement therapy,HRT)，以缓解因雌激素不足引起的临床症状[5]，主要治疗和预防女性绝经后出现的更年期综合征，防治骨质疏松症[6]，预防老年痴呆症和冠心病[7]等。目前，关于孕马尿中结合雌激素的相关研究主要集中在萃取方法、测定方法以及不同妊娠阶段含量的变化方面[8-10]，对于提高孕马尿中结合雌激素含量的研究鲜见。哈萨克马是新疆主要的马种，具有乳、肉、役兼用的性能，耐粗饲、耐高寒、适应能力强。哈萨克马是新疆地区提供孕马尿原料的主要马种，提高哈萨克孕马尿中结合雌激素的含量可增加牧民的经济收入。因此，本试验以妊娠中后期的哈萨克孕马为研究对象，通过补喂硫酸钠、微量元素及其组合探究其对孕马血浆及尿中3种雌激素硫酸盐（雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠）含量的影响，为维持哈萨克马孕期激素正常分泌和提高孕马尿中结合雌激素的含量提供参考依据。

## 1　材料与方法

### 1.1 试验时间与地点

试验时间：2012年11月至2013年3月；试验地点：新疆伊犁哈萨克自治州新源县阿勒玛勒乡。

### 1.2 试验动物选择

试验以配种日期相近的原则选择年龄5～7岁、第2～4胎妊娠中期的哈萨克母马34匹。

### 1.3 试验设计

将34匹哈萨克孕马随机分为4个组，分别为对照组9匹、试验Ⅰ组9匹、试验Ⅱ组8

匹、试验Ⅲ组 8 匹。所有孕马在相同的饲喂条件下饲养，试验第 1～30 天，对照组每匹马每天补喂 50 g 玉米粉，试验Ⅰ组每匹马每天在补喂 50 g 玉米粉的基础上再补喂 6 g 硫酸钠（购自天康生物股份有限公司，分析纯），试验Ⅱ组每匹马每天在补喂 50 g 玉米粉的基础上再补喂 5 g 微量元素（购自天康生物股份有限公司，包括铜、锌、铁、锰、硒，含量分别为 1.34%、5.38%、6.72%、5.38%、0.014%），试验Ⅲ组每匹马每天在补喂 50 g 玉米粉的基础上再补喂 6 g 硫酸钠+5 g 微量元素；试验第 31～90 天，对照组每匹马每天补喂 100 g 玉米粉，试验Ⅰ组每匹马每天在补喂 100 g 玉米粉的基础上再补喂 12 g 硫酸钠，试验Ⅱ组每匹马每天在补喂 100 g 玉米粉的基础上再补喂 5 g 微量元素，试验Ⅲ组每匹马每天在补喂 100 g 玉米粉的基础上再补喂 12 g 硫酸钠+5 g 微量元素。整个试验期为 90 d。补喂玉米粉的目的是让硫酸钠和微量元素与玉米粉混合，利于马匹采食硫酸钠和微量元素。

1.4 饲养管理

所有试验马匹均采用舍饲，每天分别于饮水时在运动场活动 2 h（12:00—13:00、18:00—19:00）。将马匹每天的玉米粉、硫酸钠及微量元素补喂量平均分 2 等份，分别于 09:00 和 20:00 用料盆补喂，确保每匹马补喂量准确及采食干净。试验马匹饲喂的粗饲料为青干草和苜蓿，饲喂比例为 4:1。每天饲喂 5 次，分别于 09:00、12:00、16:00、20:00 和 00:00 饲喂，确保自由采食。粗饲料营养水平见表 1。

表 1 粗饲料营养水平（干物质基础）

Table 1 Nutrient levels of roughage (DM basis) %

| 项目 Items | 青干草 Hay | 苜蓿 Alfalfa |
|---|---|---|
| 干物质 DM | 94.11 | 94.05 |
| 有机物 OM | 96.70 | 97.17 |
| 粗蛋白质 CP | 9.65 | 15.14 |
| 中性洗剂纤维 NDF | 63.85 | 54.06 |
| 酸性洗剂纤维 ADF | 37.52 | 39.59 |
| 钙 Ca | 0.68 | 1.35 |
| 磷 p | 0.10 | 0.18 |

1.5 样品采集及处理

于试验第 30 天的 08:30 空腹颈部静脉采集孕马血样。用肝素钠真空管采集血样，轻轻摇动采血管，然后 2 190×*g* 离心 15 min，制取血浆，标记后于-20 ℃冷冻保存。

分别于试验第 0 天（即试验开始的前 1 天）、第 30 天、第 60 天、第 90 天采集孕马尿样。将每匹孕马全天的尿液收集于桶内，混合均匀后采集 250 mL 于塑料瓶内，标记后于-20 ℃冷冻保存。

1.6 样品测定

采用高效液相色谱仪测定孕马血浆及尿中的结合雌激素——雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-二氢马烯雌酮硫酸钠的含量。

1.6.1 色谱条件

色谱柱：Ultimate® XB-C18（4.6 mm×100 mm，5 μm）（Welch Materials 公司）；检测波长：215 nm；柱温：20 ℃；流速：1 mL/min；上样量：10 μL。

1.6.2 流动相

缓冲液配制：称取三水合磷酸氢二钾（$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$）2.00 g、磷酸二氢钾（$KH_2PO_4$）1.00 g，转移到 1 L 容量瓶中，用双蒸水溶解、定容，混匀，测定 pH（应为 7.00±0.01，否则用盐酸或氢氧化钾溶液调节）。

流动相为缓冲液:乙腈（色谱纯）:甲醇（色谱纯）=680:240:80（*V*/*V*/*V*），充分混合，0.45 μm 滤膜抽滤，超声波脱气 1 h。

1.6.3 血浆处理及进样量

将血浆样充分解冻、混匀，取 0.5 mL 置于 5 mL 带盖塑料试管中，加入在 4 ℃冰箱预冷的三氯甲烷 2 mL，充分混匀，3 500 r/min 离心 15 min，小心、准确地吸取上层液（三氯甲烷比重大，在离心管中的下层液）0.3 mL，转移到 1.5 mL Eppendorf 管中，加入等体积的色谱纯甲醇 0.3 mL，混匀，置于 4 ℃冰箱，待测。上样前用小型离心机 12 000 r/min 离心 5 min，取出后吸取 10 μL 进样。

1.6.4 尿样处理及进样量

将孕马尿样充分解冻、混匀，取 0.2 mL 置于 1.5 mL Eppendorf 管中，加蒸馏水 0.8 mL，混匀，4 ℃下以 12 000 r/min 离心 10 min；取 0.4 mL 离心上清液到 1.5 mL Eppendorf 管中，加蒸馏水 0.4 mL，混匀；取 0.2 mL 稀释后的上清液到 1.5 mL Eppendorf 管中，加入 0.2 mL

色谱纯甲醇，混匀，吸取 10 μL 进样。

### 1.7 数据处理

试验数据均以平均值±标准差（mean±SD）表示，采用 SPSS 19.0 软件中的 one-way ANOVA 程序进行方差分析，并采用 Duncan 氏法进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 补喂硫酸钠、微量元素及其组合对哈萨克孕马血浆中雌激素硫酸盐含量的影响

由表 2 可知，血浆中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠含量各组间均差异不显著（*P*＞0.05）。但是，补喂硫酸钠的试验Ⅰ组以及补喂硫酸钠与微量元组合的试验III组血浆中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的含量均比对照组高，试验Ⅰ组分别比对照组提高 8.33%、10.00%和 8.11%，试验III组分别比对照组提高 12.50%、17.50%和 8.11%。

表 2　补喂硫酸钠、微量元素及其组合对哈萨克孕马血浆中雌激素硫酸盐含量的影响

Table 2　Effects of supplemental feeding sodium sulfate, trace elements and their combination on plasma estrogen sulfate contents of Kazak pregnancy horses　μg/mL

| 项目 Items | 对照组 Control group | 试验Ⅰ组 Trial group Ⅰ | 试验Ⅱ组 Trial group Ⅱ | 试验III组 Trial group III |
|---|---|---|---|---|
| 雌酮硫酸钠 Sodium estrone sulfate | 0.48±0.18 | 0.52±0.03 | 0.50±0.04 | 0.54±0.12 |
| 马烯雌酮硫酸钠 Sodium equilin sulfate | 0.40±0.09 | 0.44±0.25 | 0.40±0.21 | 0.47±0.18 |
| 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠 Sodium 17α-dihydroequilin sulfate | 0.37±0.14 | 0.40±0.24 | 0.36±0.09 | 0.40±0.20 |

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05），不同大写字母表示差异极显著（*P*<0.01），相同字母或无字母表示差异不显著（*P*>0.05）。下表同。

In the same row, values with different small superscripts mean significant difference (*P*<0.05), and with different capital letter superscripts mean extremely significant difference

($P$<0.01), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P$>0.05). The same as below.

## 2.2 补喂硫酸钠、微量元素及其组合对哈萨克孕马尿中雌激素硫酸盐含量的影响

由表 3 可知，随着孕马妊娠的进行，孕马尿中 3 种雌激素硫酸盐的含量均呈先升高再降低的趋势。在试验期内的各采样时间点，各试验组孕马尿中 3 种雌激素硫酸盐的含量与对照组均无显著差异（$P$＞0.05），但各试验组孕马尿中 3 种雌激素硫酸盐的含量在数值上均高于对照组。试验第 30 天时孕马尿中 3 种雌激素硫酸盐含量最高，此时试验III组孕马尿中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的含量达到 155.35、75.48、40.92 μg/mL。

表 3 补喂硫酸钠、微量元素对哈萨克孕马尿中雌激素硫酸盐含量的影响

Table 3 Effects of supplemental feeding sodium sulfate, trace elements and their combination on urine estrogen sulfate contents of Kazak pregnancy horses μg/mL

| 时间 Time | 指标 Indices | 对照组 Control group | 试验Ⅰ组 Trial group Ⅰ | 试验Ⅱ组 Trial group Ⅱ | 试验III组 Trial group III |
|---|---|---|---|---|---|
| 第 0 天 Day 1 | 雌酮硫酸钠 Sodium estrone sulfate | 115.17±29.89 | 107.84±44.97 | 104.26±14.24 | 105.27±28.71 |
| | 马烯雌酮硫酸钠 Sodium equilin sulfate | 56.13±24.69 | 55.33±34.73 | 55.84±10.55 | 56.60±19.72 |
| | 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠 Sodium 17α-dihydroequilin sulfate | 29.02±8.55 | 24.98±11.14 | 23.90±7.80 | 21.13±9.75 |
| 第 30 天 Day 30 | 雌酮硫酸钠 Sodium estrone sulfate | 123.57±23.34 | 151.28±17.62 | 137.31±26.69 | 155.35±27.00 |
| | 马烯雌酮硫酸钠 Sodium equilin sulfate | 52.23±29.60 | 68.09±23.00 | 66.62±28.26 | 75.48±28.36 |
| | 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠 Sodium 17α-dihydroequilin sulfate | 37.30±13.49 | 40.54±8.09 | 37.34±4.69 | 40.92±11.99 |
| 第 60 天 | 雌酮硫酸钠 Sodium estrone sulfate | 113.81±30.05 | 137.9±29.11 | 122.47±43.81 | 153.76±29.67 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Day 60 | 马烯雌酮硫酸钠 Sodium equilinsulfate | 49.65±15.73 | 65.05±26.76 | 58.16±17.67 | 69.28±49.26 |
| | 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠 Sodium 17α-dihydroequilin sulfate | 28.45±12.92 | 34.54±10.26 | 33.35±7.61 | 37.95±19.26 |
| 第 90 天 Day 90 | 雌酮硫酸钠 Sodium estrone sulfate | 114.94±33.20 | 123.37±19.61 | 120.72±27.02 | 131.94±54.33 |
| | 马烯雌酮硫酸钠 Sodiumequilin sulfate | 39.37±11.95 | 53.32±23.89 | 47.84±21.53 | 54.81±22.74 |
| | 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠 Sodium 17α-dihydroequilin sulfate | 26.88±11.58 | 31.77±4.62 | 26.89±13.67 | 30.17±4.19 |

2.3 补喂硫酸钠、微量元素及其组合对哈萨克孕马尿中雌激素硫酸盐日排出量的影响

由表 4 可知，试验期间孕马日排尿量在 3.54～5.34 L，平均为 4.33 L，各采样时间点各试验组孕马的日排尿量与对照组均无显著差异（$P$>0.05）。3 种雌激素硫酸盐日排出量数据显示，试验第 0 天，试验 II 组、试验III组 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的日排出量极显著低于对照组和试验 I 组（$P$<0.01）。各组孕马 3 种雌激素硫酸盐的日排出量均在试验第 30 天达到最高值，此时试验 I 组、试验III组雌酮硫酸钠和马烯雌酮硫酸钠的日排出量显著或极显著高于对照组（$P$<0.05 或 $P$<0.01），同时试验III组 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的日排出量也显著高于对照组（$P$<0.05）。试验第 60 天，试验 I 组、试验III组 3 种雌激素硫酸盐的日排出量均极显著高于对照组（$P$<0.01）。试验第 90 天，试验III组雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的日排出量显著高于对照组（$P$<0.05），马烯雌酮硫酸钠的日排出量极显著高于对照组（$P$<0.01）。以上结果显示，给孕马补喂硫酸钠和微量元素的组合能够显著或极显著提高孕马尿中雌激素硫酸盐的日排出量。

表 4　补喂硫酸钠、微量元素及其组合对哈萨克孕马尿中雌激素硫酸盐日排出量的影响

Table 4　Effects of supplemental feeding sodium sulfate, trace elements and their combination on urine estrogen sulfate daily outputs of Kazak pregnancy horses

| 时间 Time | 指标 Indices | 对照组 Control group | 试验 I 组 Trial group I | 试验 II 组 Trial group II | 试验III组 Trial group III |
|---|---|---|---|---|---|

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 第 0 天 Day 0 | 日排尿量 Urine daily output/(L/d) | 4.25±0.37 | 4.23±0.72 | 4.19±0.40 | 4.21±0.44 |
| | 雌酮硫酸钠日排出量 Sodium estrone sulfate daily output/（mg/d） | 489.09±42.65 | 455.98±77.58 | 436.85±41.66 | 442.66±45.93 |
| | 马烯雌酮硫酸钠日排出量 Sodium equilin sulfate daily output/（mg/d） | 238.37±20.78 | 234.00±39.81 | 233.97±22.31 | 238.00±24.69 |
| | 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠日排出量 Sodium 17α-dihydroequilin sulfate daily output/（mg/d） | 123.24±10.75$^{Aa}$ | 126.77±21.57$^{Aa}$ | 100.14±9.55$^{Bb}$ | 88.85±9.22$^{Bb}$ |
| 第 30 天 Day 30 | 日排尿量 Urine daily output/(L/d) | 4.49±0.92 | 4.94±1.06 | 4.58±0.78 | 5.34±0.77 |
| | 雌酮硫酸钠日排出量 Sodium estrone sulfate daily output/（mg/d） | 554.21±114.09$^{c}$ | 747.32±159.99$^{ab}$ | 628.33±106.52$^{bc}$ | 829.31±119.75$^{a}$ |
| | 马烯雌酮硫酸钠日排出量 Sodium equilin sulfate daily output/（mg/d） | 234.25±48.22$^{Cc}$ | 336.36±72.01$^{ABb}$ | 304.85±51.68$^{BCb}$ | 402.94±58.18$^{Aa}$ |
| | 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠日排出量 Sodium 17α-dihydroequilin sulfate daily output/（mg/d） | 167.29±34.44$^{b}$ | 200.27±42.87$^{ab}$ | 170.87±28.97$^{b}$ | 218.44±31.54$^{a}$ |
| 第 60 天 Day | 日排尿量 Urine daily output/(L/d) | 3.54±0.30 | 4.47±1.11 | 3.77±0.52 | 4.56±0.31 |
| | 雌酮硫酸钠日排出量 | 402.7±34.22$^{Bb}$ | 616.87±152.61$^{Aa}$ | 461.96±63.49$^{Bb}$ | 701.4±47.00$^{Aa}$ |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 60 | Sodium estrone sulfate daily output/（mg/d） | | | | |
| | 马烯雌酮硫酸钠日排出量 Sodium equilin sulfate daily output/（mg/d） | 175.68±14.93$^{Bb}$ | 290.99±71.99$^{Aa}$ | 219.38±30.15$^{Bb}$ | 316.03±21.18$^{Aa}$ |
| | 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠日排出量 Sodium 17α-dihydroequilin sulfate daily output/（mg/d） | 100.67±8.55$^{Cb}$ | 154.51±38.23$^{ABa}$ | 125.80±17.29$^{BCb}$ | 173.12±11.6$^{Aa}$ |
| 第90天 Day 90 | 日排尿量 Urine daily output/(L/d) | 3.71±0.40 | 4.30±1.13 | 4.14±0.42 | 4.48±0.91 |
| | 雌酮硫酸钠日排出量 Sodium estrone sulfate daily output/（mg/d） | 426.43±45.53$^{b}$ | 529.87±140.02$^{ab}$ | 499.48±50.42$^{ab}$ | 591.31±120.43$^{a}$ |
| | 马烯雌酮硫酸钠日排出量 Sodium equilin sulfate daily output/（mg/d） | 146.06±15.6$^{Bb}$ | 229.01±60.52$^{Aa}$ | 197.94±19.98$^{ABa}$ | 245.64±50.03$^{Aa}$ |
| | 17α-双氢马烯雌酮硫酸钠日排出量 Sodium 17α-dihydroequilin sulfate daily output/（mg/d） | 99.72±10.65$^{b}$ | 136.45±36.06$^{a}$ | 111.26±11.23$^{ab}$ | 135.21±27.54$^{a}$ |

## 3 讨　论

机体合成的结合雌激素主要有2类：一类是在雌激素C-3上通过葡糖醛酸化作用生成的含有葡糖醛酸基团的代谢物；另一类是在雌激素C-3上通过硫酸盐化作用生成的含有硫酸盐基团的代谢物。被结合后的雌激素失去与雌激素受体结合的能力，以硫酸盐及葡糖醛酸化物的形式随尿液排出。研究表明，正常人血浆中雌激素硫酸盐的含量高于雌激素葡糖醛酸的含量[11]。因此，雌激素硫酸盐是机体中起主导作用的结合雌激素。

雌激素硫酸盐化是机体合成雌激素硫酸盐的主要途径[12-13]，也是调节机体内源性类固醇激素稳态的主要途径[14-15]。雌激素硫酸盐是硫酸转移酶将硫酸盐转移至雌激素C-3位上形成的含有硫酸盐基团的代谢产物[16]。3′-磷酸腺苷-5′-磷酸硫酸（3′-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate,PAPS）是合成结合雌激素获得硫酸基的供体。PAPS是在细胞高尔基体中发生硫酸化反应时的硫酸基供体。它从细胞质基质中转入高尔基体膜囊内，在酶的催化下，将硫酸基转移到肽链中酪氨酸残基的羟基上。PAPS在机体内部合成分2步：1）三磷酸腺苷（ATP）和硫酸根（$SO_4^{2-}$）在ATP-硫酸化酶的作用下生成焦磷酸（APS）；2）APS进一步与ATP在焦磷酸激酶(APS-kinase)的作用下形成PAPS和二磷酸腺苷(ADP)。Berglund[17]报道，硫酸盐在体内平衡最重要的因素是肾脏的重吸收，而雌激素硫酸盐的形成是在肾脏和肝脏中进行的。硫酸盐不能直接与雌激素结合，必须先与ATP在酶的催化作用下形成PAPS，再由PAPS供硫盐基与雌激素在雌激素硫酸转移酶的作用下形成雌激素硫酸盐。

孕马尿中富含雌激素类物质[4]，研究显示，每升孕马尿中雌激素类物质的含量为70～130 mg，在一个孕期内形成的雌激素类物质为50～100 g。孕马尿中的雌激素类物质主要以雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠等结合态硫酸钠盐形式存在，三者之和占雌激素总量的90%以上。影响孕马尿中结合雌激素含量的因素很多，包括年龄、胎次、妊娠阶段、饲养管理等[18]，在相同的生理阶段，饲养管理可能是影响结合雌激素合成的主要因素。研究报道，在硫酸钠的作用下，给大白鼠和小白鼠补喂对乙酰氨基酚可以增加它们血液中硫酸盐和肝脏中PAPS的含量[19-20]。Klaassen等[21]报道PAPS的含量在正常生理条件下决定了雌激素硫酸盐的含量，影响PAPS合成最重要的因素是组织中硫酸盐的含量。因此，提高孕马尿中结合雌激素含量的途径之一可能是增加机体组织中游离硫酸盐的含量。

本试验给妊娠中后期的哈萨克马补喂硫酸钠、微量元素及其组合，血浆雌激素硫酸盐含量数据显示，虽然 3 个补喂试验组与对照组差异不显著，但是 3 个补喂试验组血浆中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的含量在数值上均较对照组提高。孕马尿中雌激素硫酸盐含量变化规律显示，雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的含量均在试验第 30 天（即妊娠第 6 个月）时最高，与姚军等[22]、木拉塔力·克力木等[23]研究结果一致，说明孕马在妊娠中期尿中 3 种雌激素硫酸盐的含量最高，随后降低。姚军等[22]研究显示，在妊娠中期孕马尿中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠

的含量分别为（102.3±37.7） μg/mL、（34.8±20.6） μg/mL 和（15.8±10.1） μg/mL；木拉塔力·克力木[23]的结果显示，在妊娠中期孕马尿中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的含量分别为（124.95±75.00）μg/mL、（53.76±47.97） μg/mL 和(24.26±19.50) μg/mL。本试验中，补喂硫酸钠组和补喂硫酸钠和微量元素组合组孕马尿中 3 种雌激素硫酸盐的含量明显高于姚军等[22]、木拉塔力·克力木等[23]的研究结果，说明补喂硫酸钠、微量元素和微量元素组合能够提高孕马尿中雌激素硫酸盐的含量。对照组孕马在妊娠中期时尿中 3 种雌激素硫酸盐的含量与木拉塔力·克力木等[23]的研究结果基本接近，但略高于姚军等[22]的研究结果，可能与孕马的年龄、胎次等有关。

根据郭海娟[24]的研究结果，在妊娠 27～29 周，奥尔洛夫马平均每天的排尿量为 3.84 L，新吉尔吉斯骑乘型马为 4.08 L，新吉尔吉斯乳用型马为 3.42 L，俄罗斯速步马为 3.67 L，伊犁马为 3.95 L，上述马种雌酮硫酸钠的日排出量分别为 200.85、213.81、198.96、76.37、140.20 mg/d，马烯雌酮硫酸钠的日排出量分别为 171.31、168.50、142.46、27.54、67.05 mg/d，17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的日排出量分别为 136.03、86.11、57.21、37.21、33.22 mg/d。综合本试验结果与上述试验结果可知，在相同的妊娠阶段，不同品种、用途及饲养管理条件下，孕马尿中雌激素硫酸盐含量存在较大差异。以本试验 34 匹孕马日排尿量为依据，在妊娠中期，哈萨克马平均日排尿量为 4.84 L。以木拉塔力·克力木等[23]的研究结果为参照，其研究得出妊娠中期哈萨克马雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的日排出量分别为 604.76、260.20、117.42 mg/d，这进一步说明相同的品种在相近的妊娠阶段孕马尿中雌激素硫酸盐的含量接近，而补喂硫酸钠、硫酸钠和微量元素的组合能够提高孕马尿中雌激素硫酸盐的含量。

本试验中，补喂硫酸钠组和补喂硫酸钠和微量元素组合组孕马尿中雌激素硫酸盐的含量要高于对照组，同时也高于补喂微量元素组。此结果说明，相同的品种在同一饲养条件下，补喂硫酸钠可以提高孕马尿中雌激素硫酸盐的含量，而补喂微量元素对提高孕马尿中雌激素硫酸盐的含量无积极作用，但补喂硫酸钠和微量元素的组合能够在补喂硫酸钠的基础上进一步提高孕马尿中雌激素硫酸盐的含量。妊娠是一个复杂而多变的生理过程，需要各种营养物种共同作用来维持母畜妊娠。研究显示，微量元素除了满足母畜繁殖的需要外，还有调节繁殖激素和维持妊娠的作用[25-26]。补喂微量元素可能增加了雌酮和马烯雌酮的分泌，而补喂硫

酸钠则增加了 PAPS 的含量，在硫酸转移酶的作用下形成雌激素硫酸盐。这可能是补喂硫酸钠组及补喂硫酸钠和微量元素组合组孕马尿中雌激素硫酸盐含量高于对照组和微量元素组的原因。

## 4 结　论

① 妊娠中期哈萨克母马尿中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17 酮硫双氢马烯雌酮硫酸钠的含量随着妊娠的推进先升高后降低。

② 在本试验条件下，给哈萨克孕马补喂硫酸钠和微量元素的组合能够提高孕马尿中雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17 中雌双氢马烯雌酮硫酸钠的含量，从而显著或极显著提高雌酮硫酸钠、马烯雌酮硫酸钠、17α-双氢马烯雌酮硫酸钠的日排出量。

参考文献：


[1]BENJAMIN S,MARRIAN G F.The isolation of estrone sulfate from the urine of pregnant mare[J].Journal of Biological Chemistry,1938,126(2):663–666.

[2] MARKER R E,KAMM O,CROOKS H M,Jr.,et al.Pregnanediols in pregnancy urine of mares[J]Journal of the American Chemical Society,1937,59(11):2297–2298.

[3]KLYNEW,SCHACTTER B,MARRIAN G F.Extraction of steroid sulfates and isolation of 16-allopreganen-3(β)-ol-20-one sulfate[J].Journal of Biological Chemistry,1948,43:231–234.

[4] 张兰兰,赵文军,吴雪萍,等.孕马尿中甾体成分及其活性的研究现状[J],天然产物研究与开发,2003,15(4):354–358.

[5]LINDSAY R,GALLAGHER J C,KLEEREKOPER M,et al.Bone response to treatment with lower doses of conjugated estrogens with and without medroxyprogesterone acetate in early postmenopausal women[J].Osteoporosis International,2005,16(4):372–379.

[6]MAN R Y K,TING L K F,FAN S,et al.Effect of postmenopausal hormone replacement therapy on lipoprotein and homocysteine levels in Chinese women[J].Molecular and Cellular Biochemistry,2001,225(1/2):129–134.

[7]HONJO H,IWASA K,KAWATA M,et al.Progestins and estrogens and Alzheimer's disease[J]Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology,2005,93(2/3/4/5):305–308.

[8]孔金金.天然结合雌激素的纯化精制工艺研究和指纹图谱分析[D].硕士学位论文.乌鲁木齐:

新疆医科大学,2007.

[9]PILLAI G F,MCERLANE K M.Analysis of conjugated estrogens in a vaginal cream formulation by capillary gas chromatography[J].Journal of Pharmaceutical Sciences,1982,71(5):583–585.

[10]姚军,赵文慧,兰欢,等.孕马尿中 3 种主要结合雌激素的固相萃取-UPLC 法测定[J].中国医药工业杂志,2011,42(7):529–531.

[11] PASQUALINI J R,GELLY C,NGUYEN B L,et al.Importance of estrogen sulfates in breast cancer[J].Journal of Steroid Biochemistry,1989,34(1/2/3/4/5/6):155–163.

[12] FALANY J L,FALANY C N.Expression of cytosolic sulfotransferases in normal mammary epithelial cells and breast cancer cell lines[J].CancerResearch,1996,56(7):1551–1555.

[13] COUGHTRI M W H,SHARP S,MAXWELL K,et al.Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases[J].Chemico-Biological Interactions,1998,109(1/2/3):23－27.

[14]VISSER T J.Pathways of thyroid hormone metabolism[J].Acta Medica Austriaca,1996,23(1/2):10–16.

[15] EISENHOFER G,COUGHTRIE M W H,GOLDSTEIN D S.Dopamine sulphate:an enigma resolved[J].Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology,1999,26:S41–S53.

[16]WEINSHILBOUM R M,OTTERNESS D M,AKSOY I A,et al.Sulfotransferase molecular biology:cDNAs and genes[J].FASEB Journal,1997,11(1):13－14.

[17]BERGLUND F.Transport of inorganic sulfate by the renal tubules[J].Acta Physiologica Scandinavica,1960,49(172):1–37.

[18] 郭海娟,王旭光,孟军,等.影响妊娠伊犁马结合雌激素浓度的因素分析[J].中国畜牧兽医,2014,41(7):197–201.

[19]LIU L,KLAASSEN C D.Different mechanism of saturation of acetaminophen sulfate conjugation in mice and rats[J].Toxicology and Applied Pharmacology,1996,139(1):128–134.

[20] HJELLE J J,BRZEZNICKA E A,KLAASSEN C D.Comparison of the effects of sodium sulfate and N-acetylcysteine on the hepatotoxicity of acetaminophen in mice[J].Journal of

Pharmacology and Experimental Therapeutics,1986,236(2):526–534.

[21]KLAASSEN C D,BOLES J W.Sulfation and sulfotransferases 5:the importance of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation[J].FASEB Journal,1997,11(6):404–418.

[22]姚军,高晓黎,高茜,等.新疆孕马尿中主要结合雌激素定性定量方法研究[J].药物分析杂志,2011,31(8):1471–1474.

[23] 木拉塔力·克力木,高晓黎,肖健民,等.孕马尿中雌激素成分的研究[J].新疆医科大学学报,2009,32(4):403–405.

[24] 郭海娟.影响妊娠马结合雌激素含量因素的初步研究[D].硕士学位论文.乌鲁木齐:新疆农业大学,2014.

[25]蒲雪松.补饲几种矿物元素和维生素及外源生殖激素处理对多浪羊母羊繁殖性能影响的研究[D].硕士学位论文.乌鲁木齐:新疆农业大学,2010.

[26]任有蛇.硒源和硒水平对山羊繁殖性能和 GPxs 基因在睾丸中表达的影响[D].硕士学位论文.晋中:山西农业大学,2013.

## Effects of Supplemental Feeding Sodium Sulfate, Trace Elements and Their Combination on Three Kinds of Estrogen Sulfate Daily Outputs of Kazak Pregnancy Horses

LI Xiaobin CHEN Hui ZHAO Fang XIE Jinglong YANG Juqing YANG Kailun*

(*Xinjiang Key Laboratory of Meat & Milk Production Herbivore Nutrition, Xinjiang Agricultural University, Urumqi* 830052, *China*)

Abstract: The objective of this study was to investigate the effects of supplemental feeding sodium sulfate, trace elements and their combination on plasma and urine sodium estrone sulfate, sodium equilin sulfate, sodium 17α-dihydroequilin sulfate contents and above three kinds of estrogen sulfate daily outputs of Kazak female horses in mid-late pregnancy. Thirty-four 5- to 7-year-old and 2 to 4 fetuses Kazak horses in the middle of pregnancy were divided into 4 groups with control group had 9 horses, trial group Ⅰ had 9 horses, trial group Ⅱ had 8 horses and trial group Ⅲ had 8 horses. Under the same feeding condition, the supplemental feeding experiment lasted

*Corresponding author, professor, E-mail: yangkalun2002@aliyun.com (责任编辑 菅景颖)

for 90 days. On the 1st to 30th day, horses in the control group, trial group Ⅰ, trial group Ⅱ and trial group Ⅲ were supplemental fed 50 g corn flour, 50 g corn flour+6 g sodium sulfate, 50 g corn flour+5 g trace elements, and 50 g corn flour+6 g sodium sulfate+5 g trace elements per horse per day, respectively. On the 31st to 90th day, horses in the control group, trial group Ⅰ, trial group Ⅱ and trial group Ⅲ were supplemental fed 100 g corn flour, 100 g corn flour+12 g sodium sulfate, 100 g corn flour+5 g trace elements, and 100 g corn flour+12 g sodium sulfate+5 g trace elements per horse per day, respectively. The results showed as follows: 1) compared with the control group, the sodium estrone sulfate, sodium equilin sulfate and sodium 17α-dihydroequilin sulfate contents in plasma of sodium sulfate, trace elements and their combination groups were increased, but the differences were not significant among groups ($P>0.05$). 2) On the each sampling time points, the sodium estrone sulfate, sodium equilin sulfate and sodium 17α-dihydroequilin sulfate contents in urine of trial groups had no significant differences compared with the control group ($P>0.05$), but the but the values were still higher than those of control group. On day 30, above three kinds of estrogen sulfate contents in urine in trial group Ⅲ were all the highest. 3) The sodium estrone sulfate, sodium equilin sulfate, sodium 17α-dihydroequilinsulfate daily outputs in trial group Ⅲ were significantly or extremely significantly higher than those of control group at day 30, 60 and 90 ($P<0.05$ or $P<0.01$). It is concluded that supplemental feeding sodium sulfate, trace elements and their combination can increase the contents of urine sodium estrone sulfate, sodium equilin sulfate and sodium 17α-dihydroequilin sulfate of Kazak pregnancy horses, thus increase the daily outputs of sodium estrone sulfate, sodium equilin sulfate and sodium 17α-dihydroequilin sulfate.

Key words: Kazak pregnancy horse; sodium sulfate; trace elements; estrogen sulfate